

Komplexní využití biomasy zelených sladkovodních řas

PhDr. Ing. MILOSLAV PODOJIL, CSc., RNDr. TOMÁŠ REZANKA, CSc., Ing. VÁCLAV VOTÁPEK, Mikrobiologický ústav ČSAV

MUDr. KAREL BALÁK, DrSc., Ústav materiálu, Thomayerova nemocnice, Praha

Klíčová slova: řasy; sinice; izolace lipidů; frakcionace lipidů; identifikace mastných kyselin, alkanů, sterolů a alkoholů; testování biologické aktivity

ÚVOD

Zelené sladkovodní řasy a sinice obsahují jako majoritní složky lipidy, sacharidy a proteiny. Jejich průměrné zastoupení uvádí Lee a Picard [1] a Aeronson a Dubinsky [2] (tabulka 1).

V současné době nečiní problémy autotrofní nebo heterotrofní kultivace zelených sladkovodních řas v laboratorních rozměrech jako vhodných modelových organismů pro studium teoretických otázek vyplývajících ze vztahu struktury a funkce živé hmoty.

Tabulka 1. Procentní zastoupení obsahových látek zelené řasy *Scenedesmus* a sinice *Spirulina* (%)

Obsahová látka	<i>Scenedesmus</i>	<i>Spirulina</i>
Lipidy	12–14	2–3
Bílkovina	50–55	50–55
Sacharidy	10–17	30–35
Vlhkost	4–6	15

Při snaze o zvládnutí biotechnologie zelených sladkovodních řas vystupuje do popředí problém ekonomický. Při venkovní autotrofní kultivaci je to v našich podmínkách především limitace počtem dnů slunečního záření vedle dalších faktorů, jako kontaminace kultury. Amortizace nákladů na taková výrobní zařízení se tudíž neúměrně prodlužuje. Při heterotrofní kultivaci vystupují do popředí hlavně energetické nároky, jejichž odrazem je vysoká cena vyrobené řasové biomasy.

Úvahy o využití biomasy řas z hlediska produkce obsahových látek musí proto vycházet z ekonomických realit a hledat takové upotřebení, kde by se řasa finančně maximálně zrovnala. Domníváme se, že v úvahu přichází především produkce látek významných farmaceuticky nebo pro vědecké účely.

Z aplikací v ČSSR je zajímavé využití fotosyntetické schopnosti řas k přípravě ^{13}C - a ^{14}C -monosacharidů [3]. Extrakt zelených řas, obsahující proteiny, je vhodnou živnou půdou pro kultivaci mikroorganismů [4]. Z oboru výživy je známo, že *Chlorella* je zdrojem vhodného dietního proteinu. V extraktu horkou vodou by proteiny (popř. polysacharidy) měly být majoritními obsahovými látkami [5]. Glykoproteiny z *C. vulgaris* v pokusech *in vitro* a *in vivo* vykazovaly protinádorový účín [6].

Relativně je v literatuře nejméně údajů o využití řasových lipidů. Přehlední brožura [7] kombináta pro výrobu krmných kvasnic z nafty doporučuje lipidy kvasinek jako náhradu za živočišné a rostlinné tuky při technických a průmyslových aplikacích.

Předložená práce se zabývá izolací, dělením a analýzou lipidické frakce řas s pokusem o medicínské zhodnocení definovaných frakcí.

MATERIÁL A METODY

Organismy. Zelené sladkovodní řasy (*Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *S. acuminatus* a *S. acutus*) a sinice (*Spirulina platensis*) byly kultivovány autotrofně nebo heterotrofně na oddělení autotrofních mikroorganismů Mikrobiologického ústavu v Třeboni. Materiál k izolaci obsahových látek byl dodán ve formě lyofilizované a dezintegrované řasové hmoty s obsahem vody kolem 5%. Extrakce, dělení a derivatizace lipidních látek — (viz schéma 1).

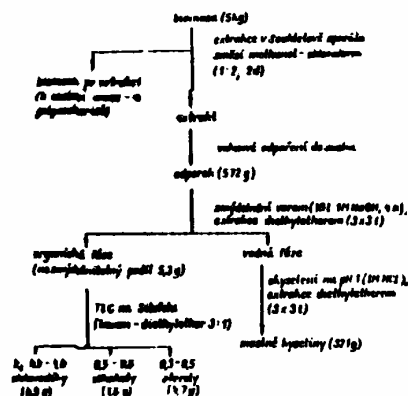


Schéma 1. Extrakce a dělení lipidních látek

Analytika. Plynová chromatografie byla prováděna na přístroji Varian Aerograph (Varian, USA) s FI-detektorem a na koloně s 1% OV-1 na stacionární fázi Chromaton NAW DMCS (80/100) (pro uhlovodíky), resp. na koloně s 3% OV-225 na fázi Chromaton NAW DMCS (80/100) (pro mastné kyseliny).

Plynová chromatografie — hmotnostní spektrometrie methylesterů a pyrrolidinů mastných kyselin, TMS derivátů alkoholů a sterolů byla měřena na přístrojích LKB 9000 (LKB Produkter AB, Švédsko) a HP 5992 B a HP 5995 (Hewlett Packard, USA) za použití skleněných kolon SCOT SE-30 (SGE, Austrálie) a WCOT SP-2330 (Supelco, USA) a fused silica kolon WCOT SE-30, SE-52 a Carbowax 20 M (Hewlett Packard, USA), a WCOT DC-510 (Macherey Nagel, NSR).

Testování účinku frakce mastných kyselin. Dermatologický účinek definované frakce mastných kyselin izolované z heterotrofně kultivované *C. kessleri* byl testován na bílých morčatech. Vzorek mastovité konsistence byl aplikován kutánně vtíráním na laterální stranu břicha. Po skončení pokusu byla kůže zvířat odebrána průbojníkem na histologické vyšetření.

VÝSLEDKY A DISKUSE

K biotechnologickým procesům se jako závěrečná fáze přifazují down-stream-operace. V našem případě byly komplikovány shodnou rozpustností jednotlivých skupin lipidů, interasociačními vlivy (schopnost sloučenin navzájem se rozpouštět) a doprovodnými nečistotami.

K oddělení lipidů od dalších buněčných složek (polární vysokomolekulární látky typu polysacharidů, bílkovin a nukleových kyselin) jsme použili jednu z modifikací Folchovy metody [8]. Extrakční činidlo je směs polárního a nepolárního rozpouštědla, která je vhodná jednak k přerušení nekovalentních vazeb mezi lipidy a vysokomolekulárními látkami, jednak nepolárnější rozpouštědlo přispívá k lepší rozpustnosti lipidů. Důležitým faktorem je dále teplota extrakce; při vyšší teplotě je extrakční mohutnost sice vyšší, ale zvyšuje se nebezpečí tepelné degradace a oxidace. K maximální výtěžnosti extrakce lipidů je nutno pracovat s dezintegrovanou fasou. Průměrný obsah lipidů v našich pokusech byl od 5 do 15 % sušiny (viz schéma 1 pro *C. kessleri* heterotrofní).

Základní složky lipidů se uvolní hydrolýzou. Přednost jsme dali alkalické hydrolýze, neboť je to reakce nevratná. Z reakční směsi jsme extrahovali nezmýdelnitelný podíl, skládající se z látek, uvedených ve schématu 1. Ze zmýdelnitelného podílu jsme po okyselení extrahovali směs volných mastných kyselin. Mastné kyseliny lze z fasové biomasy uvolnit též přímou alkalickou hydrolýzou bez předchozí extrakce lipidů organickými rozpouštědly [9].

Tabulka 2. Procentní obsah mastných kyselin v zelených fásách a sinicích

Kyselina	<i>C. kessleri</i> (heterotrofní)	<i>C. kessleri</i> (autotrofní)	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. denitrificans</i>	<i>C. platensis</i>
C_{14} až C_{22}	88	88	88	88	87
z toho C_{14} a C_{16}	80	82	78	80	78

Jak vyplývá ze schématu 1, majoritní složkou lipidů studovaných fas a sinic jsou mastné kyseliny. Představují kolem 80 % lipidů. Obvyklý počet uhlíků v řetězci (bez ohledu na větvení) se pohybuje od 14 do 22 [10], přičemž převažují kyseliny s 16 a 18 atomy uhlíku (tabulka 2). Chybí však polyenové mastné kyseliny s 20 a 22 atomy uhlíku, žádoucí z dietetického hlediska. Velmi dlouhé mastné kyseliny (C_{24} až C_{36}) jsme našli jen u *C. kessleri* kultivované heterotrofně jako minoritní složku, jejíž suma činí 0,6 % mastných kyselin [11].

Z dalších komponentů je z kvantitativního hlediska zajímavá produkce steroidů, kterých vzniká kolem 0,1 % biomasy. Kvalitativně ve směsi steroidů převládají 7-ergosterol a chondrillasterol [12].

Alkoholy a uhlovodíky jsou u fas vysloveně minoritní složky, jejichž množství i složení kolísá v závislosti na druhu fas, popř. kultivačních podmínkách [12, 13].

Předběžná studia na některých lékařských a veterinárních pracovištích v ČSSR naznačují účinnost farmakoterapie zelenými fásami [14, 15, 16].

Společným rysem těchto prací je skutečnost, že se po

dává sušená fása obsahující bohatý komplex potenciálně možných účinných látek. Nelze tedy určit látku (látky) zodpovědné za biologický účinek nebo případný synergismus. V této souvislosti je nutno upozornit, že zvláště při neudržení axenie kultury se mohou vyskytnout v biomase fas a především sinice, které tvoří toxiny, působící otravy zvířat [17]. *S. platensis* by neměla patřit k toxickým sinicím [18].

Z hlediska platných ustanovení Československého lékopisu je nutno zhodnotit surovinu — fasu — po stránce kvalitativní i kvantitativní, definovat chemické a fyzikální vlastnosti izolovaných látek a vymezit kritéria jejich medicínského, resp. veterinárního použití [19]. Tomuto požadavku jsme vyhověli definováním chemického složení frakcí lipidů. S frakcí mastných kyselin a s frakcí steroidů byly provedeny biologické pokusy *in vivo*, sledující snášenlivost těchto látek při zevní aplikaci. Na kůži pokusných zvířat (morčec) nebyly v rozmezí 1–40 dní klinické změny a frakce nepůsobí toxicky. Při mikroskopickém hodnocení byl zjištěn pozitivní účinek frakcí, spočívající ve zmnožení buněk ve všech sledovaných vrstvách epidermis a přeměně tvrdého keratinu v rohové vrstvě v měkký keratin [20].

V této souvislosti je zajímavý pozitivní účinek palmitolejové kyseliny na Ehrlichův ascitický tumor [21].

Literatura

- [1] LEE, B. H., PICARD, G. A.: Canad. Inst. Food Sci. Technol. Sci. Technol. J., 15, 1982, s. 59.
- [2] AARONSON, S., DUBINSKY, Z.: Experientia, 38, 1982, s. 38.
- [3] DOUCHA, J., KOLINA, J., PEKÁRKOVÁ, B., SMAŽIK, J., ŠETLÍK, J.: PV 643—1983.
- [4] POTUŽNÍK, V., PROKEŠ, B.: AO 19872—1977.
- [5] NAKAGAWA, H., KASAHARA, S., TSUJIMURA, A., AKIRA, K.: Bull. Japan Soc. Sci. Fisheries, 50, 1984, s. 805.
- [6] MATSUDA, S., SHINPO, K., TANAKA, K., ABE, K., KARASAWA, H.: Sci Rep. Hiroaki Univ., 38, 1983, s. 127.
- [7] VEB Petrochemisches Kombinat Schwedt, DDR: Fermenin aus Schwedt, 1979, s. 17.
- [8] KATES, M.: Technika lipidologie. Vydání, analýza i identifikace lipidů. Mir., Moskva, 1972, s. 72.
- [9] PODOJIL, M., ŘEZANKA, T., VOTÁPEK, V.: PV 10004—1984.
- [10] ŘEZANKA, T., VOKOUN, J., SLAVÍČEK, J., PODOJIL, M.: J. Chromatogr., 288, 1983, s. 71.
- [11] ŘEZANKA, T., PODOJIL, M.: Lipids, 19, 1984, s. 472.
- [12] ŘEZANKA, T., VYHNÁLEK, O., PODOJIL, M.: Folia Microbiol., 1985 (v tisku).
- [13] ŘEZANKA, T., ZAHRADNÍK, J., PODOJIL, M.: Folia Microbiol., 27, 1982, s. 450.
- [14] BALÁK, K., RYDLO, O.: Čs. gynekologie, 38, 1973, s. 95.
- [15] BALÁK, K., RYDLO, O., VOJTA, M.: Čs. gynekologie, 38, 1974, s. 378.
- [16] BALÁK, K., RYDLO, O., VOJTA, M.: Čs. gynekologie, 46, 1981, s. 463.
- [17] SANTHIVET, S., WILLIAMS, D. H., SMITH, R. J., HAMMOND, S. J., BOTES, D. P., TUINMAN, A., WESSELS, P. L., VILJOEN, C. G., KRUGER, H.: Chem. Commun., 1983, s. 652.
- [18] CLÉMENT, G.: Soc. Phycol. France Bull., 33, 1978, s. 57.
- [19] Československý lékopis, vydání III. svazek I. Avicenum Praha, 1979, s. 47.
- [20] KONRÁD, B., PODOJIL, M., PROKEŠ, B., RYDLO, O.: Čs. gynekologie, 42, 1977, s. 514.
- [21] ITO, H., KASAMA, K., NASURE, S., SHIMURA, K.: Cancer Lett., 17, 1982, s. 197.

Podojil, M. - Řezanka, T. - Votápek, V. - Balák, K.: Komplexní využití biomasy zelených sladkovodních fas. Kvas. prům. 31, 1975, č. 7—8, s. 180—182.

Ekonomie přípravy fasové biomasy vyžaduje efektivní využití i lipidické frakce, jejíž množství se pohybuje až kolem 20 % hmotnosti biomasy. Byla vypracována izolace a analýza této frakce, dělení na jednotlivé skupiny látek a studování možnosti medicínského využití těchto látek.

Подоял, М., Ржезанка, Т., Вотапек, В., Балак, К.: Комплексное использование биомассы зеленых пресноводных водорослей. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 180—182.

Экономика продукции биомассы водорослей делает возможным эффективное использование различных фракций липидов, количество которых может достигать до 20 % от веса биомассы. Была разработана изоляция фракций липидов и их анализ.

Были изучены возможности медицинского использования этих фракций.

Podejhl, M. - Resanka, T. - Votápek, V. - Balák, K.: The complex exploitation of biomass of fresh-water green algae. Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 180—182.

Economy of the preparation of algae biomass requires to make full use of the lipidic fraction, too. The amount of it reaches up to 20 % of the dry-weight. The isolation and analysis of this fraction was designed including the separation into individual groups of compounds. Also the possibility of medical use of these fractions was studied.

Podejhl, M. - Resanka, T. - Votápek, V. - Balák, K.: Die komplexe Ausnutzung der Biomasse der grünen süßwasser Algen. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 180—182.

Bei der ökonomischer Züchtung der Algenbiomasse muß man effektiv auch die Lipidfraktion ausnutzen. Die Gesamtmenge dieser Fraktion beträgt ungefähr bis 20 % von Trockensubstanz. Man hat die Isolierung und Analytik dieser Fraktion und die Trennung in einzelne Gruppen der Stoffe ausgearbeitet. Die Möglichkeit der Ausnutzung dieser Gruppe der Stoffe in Medizin wird beurteilt.